Gedruckt mit Unterstützung aus dem Jerome und Margaret Stonborough-Fonds

Ernährung und Farbstoffbildung von *Chlorosplenium aeruginosum* (Oed.)

Von

Walter Frenzel

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität in Wien, Nr. 290 der zweiten Folge.

(Mit 1 Tafel und 1 Textfigur)

(Vorgelegt in der Sitzung am 18. Oktober 1928)

Einleitung.

Schon seit langem bekannt ist die sogenannte Grünfäule des Holzes, die, wie wir heute wissen, durch *Chlorosplenium aeruginosum* (Oed.), einem zu den Ascomyceten gehörenden Pilz, hervorgerufen wird. Diese Erscheinung ist so auffallend, daß man sich wiederholt mit ihr beschäftigt hat. Neben der Klärung von Fragen, wieso es zu der grünen Farbe des Holzes kommt, ob sie ein Zersetzungsprodukt des Holzes selbst oder das Produkt eines fremden Organismus darstellt, war das Ziel vieler einschlägiger Untersuchungen, die Chemie des Farbstoffes zu studieren und zu ergründen. Es kann aber hier gleich vorweggenommen werden, daß die Natur des Farbstoffes bis heute noch nicht bekannt ist.

Trotz der jetzt feststehenden Tatsache, daß die Grünfärbung des Holzes durch einen Pilz hervorgerufen wird, welcher den grünen Farbstoff in großer Menge produziert, war der Pilz in seinem ernährungsphysiologischen Verhalten bis jetzt noch nicht untersucht und auch die näheren Bedingungen seiner Reinkultur und der Farbstoffbildung waren völlig unbekannt. Diesen Fragenkomplex experimentell zu bearbeiten und zu klären, war vor allem die Aufgabe vorliegender Untersuchung. Hiebei erwies sich eine Gliederung in zwei für sich ziemlich geschlossene Teile als zweckmäßig, indem im ersten Teil die Möglichkeiten der Gewinnung von Reinkulturen und die Ernährungsphysiologie behandelt werden sollen, während der zweite Teil dem chemischen Verhalten des Farbstoffes und seinen Modifikationen unter dem Einfluß der verschiedenen Kulturbedingungen gewidmet ist.[1]

Meinem hochverehrten Lehrer Herrn Prof. Dr. Hans Molisch gestatte ich mir, an dieser Stelle für die Anregung zu dieser Arbeit sowie für die stete Unterstützung und Förderung, die er mir hiebei angedeihen ließ, meinen ergebensten Dank abzustatten. Ferner erlaube ich mir, Herrn Prof. Dr. G. Klein für das rege fördernde Interesse, das er meiner Arbeit entgegenbrachte, und Herrn Dozenten Dr. J. Kisser, der mir in liebenswürdigster Weise stets durch seine Ratschläge behilflich war, meinen wärmsten Dank auszusprechen.

© Verlag Akademie der Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

I. Ernährungsphysiologie.

1. Historisches.

Die erste Arbeit, welche sich auf die Grünfäule des Holzes bezog, stammt aus dem Jahre 1813 von Döbereiner. Er, wie auch die späteren Autoren (Gümbel 1858, Bley 1858, Caspary 1864, Vauquelin 1866) befaßten sich hauptsächlich mit der Chemie des Farbstoffes und waren der Meinung, ein Zersetzungsprodukt des Holzes vor sich zu haben. Diese Ansicht erschien dadurch gestützt, daß oft weite Strecken des grün gefärbten Holzes ohne jede Spur von Organismen gefunden wurden, was auch Fordos (1863) bestimmte, den Gedanken an eine Pilzwirkung als Ursache der Grünfärbung aufzugeben. Die ersten, welche mit Sicherheit annahmen, daß die Grünfärbung des Holzes von dem Pilz *Chlorosplenium aeruginosum* (Oed.) (oder *Peziza aeruginosa* [Pers.], wie man ihn damals nannte), herrühre, waren Crum-Brown (1864/65) und Tulasne (1865). Rommier (1868) ließ die Frage der Herkunft des Farbstoffes, die ihm als Chemiker ferner lag, offen, und begnügte sich mit einem Hinweis auf die Möglichkeit einer Pilzwirkung. Die Tatsache der Grünfärbung des auf dem grünen Holz vorkommenden Pilzes *Chlorosplenium aeruginosum* (Oed.) erklärte Prillieux (1877) damit, daß der als Zersetzungsprodukt des Holzes entstandene Farbstoff von jenem bei seinem Wachstum auf dem Holz unverändert aufgenommen werde. Noch de Bary (1881) wagte es nicht, sich in dieser Streitfrage zugunsten der einen oder anderen Anschauung zu entscheiden. Schließlich gewann die Ansicht, daß der Farbstoff von *Chlorosplenium aeruginosum* (Oed.) gebildet werde, die Oberhand (Liebermann 1874, Hartig 1882, Zukal 1887, Brefeld 1891, Frank 1895, Vuillemin 1897, Lafar 1906, Sorauer 1908) um so mehr, als dies zum Teil durch Kulturversuche bewiesen wurde. Das Vorkommen von pilzfreiem grünfaulen Holz wurde durch die Annahme erklärt, daß in diesem Fall die Hyphen schon zugrunde gegangen sind und der Farbstoff im Holz zurückgeblieben ist. Zuletzt befaßte sich ausführlichst Vuillemin (1897) mit dem grünfaulen Holz in einer Arbeit, die sich hauptsächlich mit der Morphologie von *Chlorosplenium aeruginosum* (Oed.) und der Lokalisation des Farbstoffes beschäftigt und außerdem eine eingehende Literaturbesprechung enthält. Besondere Erwähnung verdient die Behauptung, daß die Grünfäule überhaupt keine »Fäulnis« ist, sondern im Gegenteil dem Holze eine besondere Resistenz verleiht, so daß es hart bleibt und für Drechslerarbeit Verwendung findet. Die Grünfäule zeigt sowohl totes, bereits angegriffenes Holz als auch abgestorbenes Holz an noch lebenden Bäumen, ohne daß sie jedoch auf die noch lebenden Teile übergreift (p. 91). Vuillemin will fernerhin festgestellt haben, daß der Farbstoff an kleine Eiweißkörper gebunden ist, die sich durch Zweiteilung vermehren, und analog dem Chlorophyll der Assimilation dient (p. 136), eine Annahme, die wohl als gänzlich verfehlt bezeichnet werden muß.

2. Die Reinkultur.

Die erste Angabe über Kulturversuche mit *Chlorosplenium aeruginosum* (Oed.) findet sich in Hartigs »Lehrbuch der Baumkrankheiten« (1882), wo dieser angibt, daß man sich in Hannover bemühe, durch künstliche Züchtung grünfaules Holz in größerer Quantität zwecks technischer Verwendung des Farbstoffes zu erzeugen. Die Methode war hier wohl dieselbe, wie sie R. v. Wettstein (nach Zukal) anwandte, als er mit grünfaulem Holz durch einfaches Herüberwachsenlassen des Myzels totes Holz infizierte. Um Reinkulturen handelte es sich dabei sicher nicht. Brefeld gelang es als erstem in einer leider nicht näher angegebenen Nährlösung aus Ascosporen farblose und grüne untergetauchte Myzelien rein zu ziehen.[1] Einer persönlichen Mitteilung zufolge kultivierte

[1] Nach eigenen Beobachtungen keimen die Ascosporen ungemein leicht sogar in destilliertem Wasser.

H. Molisch in Japan (1924) auf gedämpftem Reis *Chlorosplenium aeruginosum* (Oed.) in Reinkultur, welche aus einem grünen Holzflitterchen gewonnen wurde. Die Reinkulturen, welche das Ausgangsmaterial für vorliegende Untersuchungen bildeten,[1] stammten von K. Lettmayr, welcher am hiesigen Institut nach vergeblichen Versuchen, den Pilz aus Holz rein zu ziehen, Kulturen aus sterilen Teilen von oberflächlich abgeflammten Fruchtkörpern auf folgendem von Claussen angegebenen, etwas modifizierten Nährboden bekam: 2% Agar, 2% Glukose, 0·05% KH_2PO_4, 0·05% NH_4NO_3, 0·02% $MgSO_4$, 0·001% $Fe_3(PO_4)_2$, zirka 95% H_2O.

Demnach bestehen zur Gewinnung von Reinkulturen verschiedene Möglichkeiten. Einerseits lassen sich direkt aus Ascosporen reine Myzelien ziehen oder aus Teilen des Fruchtkörpers, wobei sowohl die Ascosporen als auch die Hyphen für die Entwicklung des Myzels in Betracht kommen können. Anderseits erhält man auch aus rein vegetativen Hyphen Kulturen durch Impfung kleiner, mit dem Pilz infizierter Holzpartikelchen.

3. Eigene Untersuchungen.

Mit Hilfe der Reinkulturen war es nun möglich, die Bedingungen des Wachstums und damit im Zusammenhang die Bildung des Farbstoffes und ferner das ernährungsphysiologische Verhalten zu studieren. Da die verschiedensten Faktoren hiebei eine Rolle spielen können, wurde gleich von Anfang an auf den verschiedenen Einfluß der Außenbedingungen geachtet und dieser dann einzeln für sich verfolgt. Es kamen zur Untersuchung:

1. Die chemische Zusammensetzung des Nährbodens.
2. Die Reaktion des Nährbodens.
3. Der Sauerstoffmangel.
4. Die Temperatur.
5. Licht und Dunkelheit.

Der Pilz wurde zum größten Teil in Erlenmeyerkölbchen von zirka 250 cm^3 Inhalt kultiviert. Petrischalen kamen für die Kulturen nur selten zur Verwendung, da infolge des langsamen Wachstums die Kulturdauer oft mehrere Monate beanspruchte und dabei eine Austrocknung des Substrates oder eine Infektion zu befürchten war. In einzelnen speziellen Fällen wurden die Kulturen in Eprouvetten angelegt.

1. Die chemische Zusammensetzung des Nährbodens.

a) Das natürliche Substrat.

Die verschiedenen Literaturangaben über das Vorkommen von *Chlorosplenium aeruginosum* (Oed.) auf Holzstücken bestimmter

[1] Daß es sich um absolute Reinkulturen handelte, wurde durch wiederholte mikroskopische Kontrolle und Überimpfung auf verschiedene Bakteriennährböden erwiesen. Auch im Laufe der Untersuchung wurde auf diese Art stets die absolute Reinheit der Kulturen kontrolliert.

© Verlag Akademie der Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Bäume, wobei übereinstimmend hauptsächlich Buchen- und Eichenholz besonders genannt sind, gaben zu der Frage Anlaß, ob der Pilz auf jeder Holzart wächst oder nur bestimmte Hölzer bevorzugt. Um dies zu klären, wurden Versuchsserien mit verschiedenen Holzsorten angestellt, wobei frisches, entrindetes Astholz (durchwegs Splintholz) verwendet wurde, welches im Herbst und Winter beschafft wurde und daher reich an Reservestoffen war. Das Holz wurde in Stücke von 1 *dm* Länge und etwa 1 *cm* Durchmesser zugeschnitten; am unteren Ende wurden dann die Stücke, um ein Austrocknen zu verhindern, mit Watte umwickelt, in Eprouvetten übertragen und so viel destilliertes Wasser zugesetzt, daß die Watte vollends durchtränkt war. Hierauf wurden die Eprouvetten verschlossen und sterilisiert. Ein Vorversuch mit Buchen-, Eichen-, Birken-, Ahorn- und Eschenholz ergab nach drei Wochen in allen Kulturen zuerst farbloses Anwachsen und im weiteren Verlauf schön blaugrünes Wachstum. Da sich kein Wachstumsunterschied in Licht und Dunkel zeigte, wurde die Hauptversuchsserie nur im Licht bei mittlerer Zimmertemperatur aufgestellt. Geimpft wurde am 7 Jänner aus Agar- und Holzdekoktkulturen mit dem gleichen Resultat. Die folgende Übersicht (Tabelle I) gibt die Verhältnisse zu Ende des Versuches am 16. Mai wieder.

Aus der Zusammenstellung in Tabelle I ist zu ersehen, daß die Mehrzahl der Holzarten dem Eindringen des Pilzes keinen Widerstand entgegensetzt und nur bei wenigen ein äußerst schwaches, rein oberflächliches Wachstum zu finden ist. Im allgemeinen ist das Wachstum als ein sehr langsames zu bezeichnen. Besten Falles war nach einer Kulturdauer von vier Monaten das Holzstück in seiner Länge von 1 *dm* vom Pilz gänzlich überwachsen, der dabei maximal bis zu einer Tiefe von $^1/_2$ *cm* eingedrungen ist. Was die Färbung des Holzes anbelangt, so ist sie, abgesehen von den Fällen farblosen Wachstums, von einem je nach der Holzart verschieden getönten Grün. Die Kulturversuche zeigen ferner eindeutig, daß das Holz nicht eine vorhergehende Zersetzung durch holzzerstörende Organismen zu erfahren braucht, um für den Pilz angreifbar zu sein, sondern daß frisches Holz, das allerdings eine Vorbehandlung durch Sterilisation mitgemacht hat, befallen werden kann. Ob aber in der Natur frisches Holz durch unseren Pilz im erfolgreichen Konkurrenzkampfe mit schneller wachsenden holzzersetzenden Pilzen angegriffen wird oder der Angriff auf ein schon im einem bestimmten Stadium der Zersetzung befindliches Holz leichter möglich und daher die Regel ist, möge dahingestellt bleiben. Jedenfalls kann bei einem Saprophyten, wie es *Chlorosplenium aeruginosum* (Oed.) ist (ein Fall von einem Angriff lebenden Holzes ist nicht bekannt, vgl. Vuillemin, p. 91), keinesfalls aus dem Stand der Zersetzung in dem natürlich infizierten Holz eindeutig auf die Art der abbauenden Tätigkeit des Pilzes geschlossen werden, da eben das Holz beim Befall schon einen gewissen Grad der Zersetzung durchgemacht haben kann. Um die Art der abbauenden Wirkung des Pilzes im

Tabelle I.

(+ = äußerst schwaches, kümmerliches Wachstum; +-+-+-+ = sehr gutes Wachstum; +-+, +-+-+ = die entsprechenden Zwischenstufen).

Holzart	Oberflächenwachstum	Eindringen in das Holz, angegeben in Millimetern (in der Längs- und Querrichtung)	Farbe
Coniferae			
Picea excelsa . .	+-+-+	5, 3	blaugrün
Abies alba . .	+-+-+	4, 2	
Larix decidua . .	+-+-+	3. 1	
Pinus silvestris .	+-+-+	3, 1	
Pinus montana .	+-+-+	2, 1	
Betulaceae			
Betula pendula . .	+-+	3, 1·5	
Carpinus betulus	+-+-+	1 1	gelblichgraugrün
Fagaceae			
Fagus silvatica	+-+-+-+	1	blaugrün
Quercus robur .	+-+-+-+	1	»
Ulmaceae			
Ulmus scabra . .	+-+	1 1	graugrün
Loranthaceae			
Viscum album .	+-+	nur oberflächlich	farblos
Saxifragaceae			
Deutzia scabra . . .	+-+	1, 0	farblos bis grün
Ribes grossularia . .	+-+	2, 1	bläulichgraugrün
Rosaceae			
Pirus communis . .	+-+-+-+	3, 2	blaugrün
Malus pumila . .	+-+-+	2·5, 1·5	
Crataegus monogyna . .	+	nur oberflächlich	farblos
Prunus Pissardii . .	+		gelblichgrau
Simarubaceae			
Ailanthus altissima . . .	+-+-+	1	hellbläulichgrau
Aceraceae			
Acer campestre .	+-+-+-+		blaugrün
Tiliaceae			
Tilia platyphyllos .	+	oberflächlich	farblos
Oleaceae			
Fraxinus excelsior .	+-+-+	1·5, 1	bläulichgraugrün
Forsythia viridissima .	+-+-+	2, 1	graugrün
Syringa vulgaris . .	+-+-+	2, 1	blaugrün
Ligustum vulgare .	+-+-+	3, 1	gelbgrün
Caprifoliaceae			
Sambucus nigra . .	+-+-+	1	gelbgrün
Symphoricarpus mosus .	+	oberflächlich	farblos
Lonicera xylosteum .	+-+-+	2·5, 1·5	hellbläulichgrau

 © Verlag Akademie der Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Holz festzustellen, wurden Untersuchungen an dem infizierten Holz der Reinkulturen angestellt, welche allein für eine eindeutige Lösung der Frage in Betracht kommen. Mikrotomschnitte (quer, radial, tangential) von Laubhölzern (Quercus, Fagus) ergaben, daß der Pilz hauptsächlich in den Gefäßen und im Holzparenchym wucherte, aber nicht in den Libriformfasern und daß ferner seine Hyphen die Markstrahlzellen erfüllten. Das Holz zeigte keinerlei Korrosions- oder Destruktionserscheinungen. Die Behandlung mit Anilinsulfat und Phloroglucin und Salzsäure ergab in den infizierten und nichtinfizierten Stellen gleich kräftige Gelb-, beziehungsweise Rotfärbung. Ebenso zeigten sämtliche Teile des Holzes nach der Behandlung mit Eau de Javelle zwecks Entfernung des Lignins in gleicher Weise kräftige Chlorzinkjodreaktion. Zur Untersuchung des Wachstums in Nadelhölzern wurden Schnitte von mit *Chlorosplenium aeruginosum* (Oed.) geimpftem Lärchenholz angefertigt. Hier wucherte der Pilz allgemein in den Tracheiden, und zwar häufiger im Frühjahrs- als im Herbstholz, ferner in den Markstrahlzellen und Harzgängen. An Tangentialschnitten konnte deutlich an einigen Stellen das Eindringen von Pilzhyphen durch die Tüpfel in die benachbarte Tracheide beobachtet werden (Fig. 7), eine Tatsache, welche bereits von Vuillemin beschrieben wurde. Korrosions- oder Destruktionserscheinungen konnten auch hier nicht festgestellt werden.

Dieses negative Ergebnis in bezug auf den Lignin- und Zelluloseabbau kann auf zweierlei Art eine Erklärung finden. Daß keinerlei Holzzerstörung sichtbar ist, kann darin seine Ursache haben, daß die Kultur noch zu jung und der Befall noch zu gering war für einen Holzabbau, indem zuerst die leichter angreifbaren Reservestoffe in den Zellen (vgl. später das Wachstum auf Stärkekleister) verbraucht werden und danach erst die Holzzersetzung einsetzt. Dafür spricht auch die Art des Eindringens des Pilzes in das Innere des Holzes in den mit Reservestoffen erfüllten Partien (Markstrahlen, Holzparenchym), die allerdings auch die Stellen geringsten Widerstandes bedeuten. Die später zu erwähnenden Kulturversuche auf Filterpapier würden die Fähigkeit des Pilzes, Zellulose abzubauen, beweisen. Bei der Annahme einer Holzzerstörung durch den Pilz käme nur eine Einreihung unter die Destruktionserreger in Betracht (nach Falck), wofür unter anderem der Angriff durch vereinzelte Hyphen spricht und das verhältnismäßig schnellwüchsige Myzel, mit dessen Hilfe die angreifbaren Oberflächen erobert und das Holz von außen nach innen fortschreitend befallen wird.

Eine zweite Möglichkeit der Erklärung ist die, daß die Grünfäule überhaupt kein Holzzersetzungsprozeß ist (nach Vuillemin), sondern nur die Inhaltsstoffe und die Abbauprodukte anderer Organismen angegriffen werden. Dafür würde die Angabe Vuillemins sprechen, daß das grüne Holz, wenn es nicht anderweitigen Zerfallserscheinungen ausgesetzt war, hart ist und daher die Möglichkeit einer technischen Verwertbarkeit besteht, wie sie von Berkeley (ziliert nach Tulasne) angegeben wurde.

Um wieder zu den Kulturversuchen zurückzukehren, so wurde das natürliche Substrat des Holzes auch in Form von Sägespänen (speziell untersucht an Buchenholzsägespänen) mit destilliertem Wasser oder anorganischer Nährlösung durchfeuchtet in Kölbchen dargeboten. Nach zwei Monaten war in beiden Fällen ohne Unterschied die ganze Oberfläche der Sägespäne mit dunkelgrünem Myzel überzogen. Ein ausgezeichnetes Nährsubstrat bildet auch Holzdekokt (speziell untersucht an Lärchen- und Buchenholzdekokt), in dem bereits nach einer Woche schwach beginnendes Wachstum zu bemerken ist und schließlich der Pilz am Boden in gallertigen Rasen und Klumpen submers wächst. Daß auf Sägespänen und besonders auf Holzdekokt das Wachstum ein ungleich rascheres gegenüber ganzen Holzstücken ist, hat vielleicht darin seinen Grund, daß hier beim Wachstum und der Entwicklung der Hyphen des Pilzes keine mechanischen Widerstände zu überwinden sind und die aus dem Holz stammenden und verwertbaren Nährstoffe frei zutage liegen. Auf Holzdekoktagar erfolgt das Anwachsen entsprechend dem langsameren Wachstum auf Agar überhaupt erst nach 14 Tagen und ebenso ist im weiteren Verlauf das Wachstum ein langsameres. In den Eprouvetten mit den Holzkulturen konnte öfter bemerkt werden, daß, sowie das Wachstum des Myzels auf dem Holz die im unteren Teil der Eprouvette befindliche Flüssigkeit erreicht hatte, die infolge des Erhitzens bei der Sterilisation einem Holzdekokt gleichkam, das Wachstum unabhängig vom Holz ein üppigeres wurde und der Pilz, halb oberflächlich, halb untergetaucht in der Flüssigkeit wucherte.

b) Künstliche Nährböden.

Anschließend an die erwähnten Nährböden, welche dem natürlichen Substrat mehr oder minder entsprachen, wurde eine Reihe organischer Nährböden unbekannter Zusammensetzung verwendet, auf denen der Pilz sich durchwegs gut entwickelte. So konnte im Pflaumendekokt zuerst farbloses, dann grünes untergetauchtes Wachstum erzielt werden. Pflaumendekokt und Malzextrakt bildeten in Verbindung mit Agar die besten der verwendeten Nährböden in fester Form, indem nach zwei Monaten Kulturdauer das ganze Substrat vom Pilz grün durchzogen war. Auf gedämpftem Reis war langsames, grünes Wachstum zu konstatieren.

Zur Herstellung von festen Nährböden bei Zugabe von Nährstoffen bekannter Zusammensetzung wurde Agar und Gelatine verwendet, ersterer zu $1^1/_2\%$, letztere zu 5%, Prozentsätze, die durch vergleichende Versuche sich für das Wachstum als die günstigsten ergaben. Dazu kamen je nach Bedarf 2% eines Kohlehydrats oder einer anderen organischen C-, beziehungsweise N-Quelle und die anorganischen Nährstoffe in den von K. Lettmayr (nach Claussen) verwendeten, bereits erwähnten Mengen, nämlich $0{\cdot}05\%$ KH_2PO_4, $0{\cdot}05\%$ NH_4NO_3, $0{\cdot}02\%$ $MgSO_4$, $0{\cdot}001\%$ $Fe_3(PO_4)_2$ oder $FeSO_4$.

Die Untersuchung des Wachstums auf Agarnährböden bei Variation der C-Quelle in Form von Kohlehydraten lieferte nach sechs-

 © Verlag Akademie der Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

monatiger Kulturdauer, unabhängig von Licht und Dunkelheit, die in folgender Übersicht (Tabelle II) zusammengestellten Ergebnisse. Sowohl hier, als auch in allen folgenden Versuchen wurden stets die optimalsten Verhältnisse bei einer größeren Anzahl von aufgestellten Kulturen mit gleichem Nährboden angegeben.

Tabelle II.

(Aufgestellt bei mittlerer Zimmertemperatur.)

Agar mit anorganischer Nährlösung und Zusatz von	Radius der Kultur mit der Impfstelle als Zentrum	Farbe
Monosaccharide		
Glukose ..	2	blaugrün
Fruktose ..	2	farblos bis hellblaugrün
Disaccharide		
Saccharose.. ..	2·5	blaugrün
Laktose ..	2·5	
Polysaccharide		
(Kartoffel-) Stärke. ..	1·5	
Dextrin..	2	»
Inulin (Dragendorff)	1	braun
Kontrolle ohne Kohlehydratzugabe	1	hellgraugrün

Hervorzuheben ist das braune Wachstum auf Inulin, das helle Wachstum auf Fruktose, ferner die Tatsache, daß dem Pilz auch die Polysaccharide, die im Agar vorhanden sind, allein schon zu einem schwachen Wachstum genügen.

In einer weiteren Versuchsserie wurden Agarnährböden hergestellt mit Zugabe einer organischen N-Quelle, die zugleich als C-Quelle dienen sollte, weshalb kein Kohlehydrat beigegeben wurde. Die wieder von Licht und Dunkelheit unabhängigen Resultate nach dreimonatiger Kulturdauer sind in der Tabelle III zusammengestellt.

Die Verwertbarkeit der dargebotenen Organika als N- und C-Quelle ergibt sich schon aus dem Vergleich mit der früher angeführten Kultur auf Agar ohne Kohlehydrat durch das stärkere Wachstum und den qualitativen Unterschied des farblosen Wachstums außer bei der Zugabe von Asparaginsäure und Asparagin. In der früher besprochenen Versuchsserie hatten die Kulturen nach drei Monaten schon die entsprechenden Farben gezeigt. Bei Darbietung von Saccharose als C-Quelle und Asparagin als N-Quelle in einem Agarnährboden ergab sich in der gleichen Zeit kein Unterschied gegenüber dem Wachstum auf einem Saccharoseagar mit anorganischer N-Quelle. Im allgemeinen ist, wie schon früher erwähnt, das Wachstum auf einem Agarnährboden durch große Langsamkeit ausgezeichnet.

Tabelle III.

(Aufgestellt bei mittlerer Zimmertemperatur.)

Agar mit anorganischer Nährlösung und Zusatz von	Radius der Kultur mit der Impfstelle als Zentrum	Farbe
Organische Ammoniumsalze		
Ammonzitrat	kein Wachstum (nach einem weiteren Monat 1 *cm*)	— (hellgrün)
Aminosäuren		
Glykokoll	0·5 *cm*	farblos
Alanin	0·5	
Leucin	1	
l-Tyrosin	1	
Asparaginsäure (Agar flüssig)	0·4 (in kleinen Räschen)	hellgrün
Asparagin ..	0·75	blaugrün
Eiweißstoffe		
Pepton (Witte) ..	1	farblos

Auf einem Gelatinenährboden dagegen ist das Wachstum ungefähr doppelt so schnell. Die Wuchsform ist hier allgemein im Vergleich zu den Agarkulturen mit dendritenartiger Randbegrenzung (Fig. 1) dadurch ausgezeichnet, daß die Randhyphen die Myzelscheibe ziemlich gleichmäßig begrenzen, ferner die Farbstoffproduktion eine geringere ist, daher die Kulturen heller sind und außerdem häufig schöne Hexenringbildung zeigen (Fig. 2). Der Pilz ist imstande, die Gelatine zu verflüssigen, und zwar je nach den zugefügten Nährstoffen entweder vom Anfang an oder auf jeden Fall nach einer bestimmten Dauer eines ohne Verflüssigung vor sich gehenden Wachstums, wobei gewöhnlich eine Verfärbung der verflüssigten Gelatine ins Bräunliche eintritt. In diesem Stadium macht die Kultur den Eindruck des Verfalls, was dadurch zum Ausdruck kommt, daß sich Myzelflocken vom Rand loslösen und dieser dann wie ausgefranst erscheint. Die Natur der Verflüssigung wurde an einer Inulingelatine untersucht und als eine fermentative erkannt. Es wurden in Eprouvetten Esmarchsche Rollkulturen von Gelatine hergestellt, in diese zwei bis drei Tropfen der verflüssigten Gelatine übertragen und in einem kühlen Raum stehengelassen. Nach einer Woche war die Gelatine abgeronnen und vollständig verflüssigt. Nachstehende Tabelle IV gibt die Verhältnisse des Wachstums auf Gelatinenährböden wieder bei Variation der organischen C- und N-Quelle.

Die Wachstumsintensität ist bei den einzelnen Kulturen ziemlich gleich, so daß von einer eigenen Aufzeichnung Abstand genommen wurde. Die Myzelscheiben erreichten Größen bis zu 5 *cm* Durchmesser. Was den Einfluß des Lichtes anbelangt, so wird darauf später in einem besonderen Abschnitt zurückgekommen werden. Das wichtigste Ergebnis der Kulturversuche auf Gelatinenährböden

© Verlag Akademie der Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

ist die Konstatierung der Tatsache, daß der Pilz auf Gelatine ohne Zugabe einer besonderen C- oder N-Quelle zu gedeihen vermag. Die Unterschiede bei Hinzufügung anderer Nährstoffe betreffen in erster Linie die Verflüssigung und die unzweifelhaft damit in Zusammenhang stehende Farbe der Kulturen sowie der verflüssigten Gelatine, in die der Farbstoff hinauszudiffundieren vermag. Wenn von einer Kultur mit Gelatineverflüssigung auf einen Nährboden abgeimpft wurde, auf dem anfänglich keine Verflüssigung einzutreten pflegte, war zuerst eine äußerst schwache Verflüssigung zu bemerken, dann aber, da keine weiteren proteolytischen Fermente erzeugt wurden, nahm das Wachstum ohne Verflüssigung seinen Fortgang.

Tabelle IV

(Aufgestellt bei mittlerer Zimmertemperatur.)

+ = Verflüssigung vom Beginn des Wachstums an; O = Verflüssigung erst nach längerer Kulturdauer.

Gelatine mit anorganischer Nährlösung und Zusatz von	Verflüssigung	Farbe des Myzels nach 5 Wochen	Farbe der verflüssigten Gelatine nach 10 Wochen
Mehrwertige Alkohole			
Glycerin ..	+	gelbgrün	farblos bis schwach grünlich
Mannit . ..	O		bräunlich
Sorbit	O		
Monosaccharide			
Glukose ..	O		
Fruktose .	O		
Galaktose	O		Dunkel: bräunlich Licht: gelbgrün
Disaccharide			
Saccharose	O		bräunlich
Maltose	+	Dunkel: farblos Licht: gelbgrün	Dunkel: bräunlich Licht: schw. gelbgrün
Laktose ..	+	Dunkel: farblos Licht gelbgrün	Dunkel: farblos Licht: gelbgrün
Polysaccharide			
Dextrin	O	gelbgrün	bräunlich
(Kartoffel-) Stärke	O	blaugrün	Dunkel: bräunlich Licht: gelbgrün
Inulin (Dragendorff)	+	farblos bis bräunlich	kaum verfärbt
Aminosäuren			
Asparaginsäure (verflüssigt)	—	Dunkel: hellblaugrün Licht: dunkelblaugrün	farblos
Alanin	+	Dunkel: farblos Licht: gelbgrün	Dunkel: farblos Licht: hellblaugrün
Eiweißstoffe			
Pepton (Witte). ..	+	farblos	Dunkel: farblos Licht: braun
Saccharose + Asparagin ..	O	gelbgrün	bräunlich
Gelatine ohne C-Quelle	+	hellbläulichgrün	farblos (grünstichig)
Gelatine ohne C- und N-Quelle .	+		

Agar und Gelatine, die dem Pilz schon allein das Wachstum ermöglichen, in Verbindung mit den entsprechenden Nährsubstanzen konnten keine sicheren Schlüsse über deren Verwertung zulassen. Hier war einzig und allein die Kultur in flüssigen Nährmedien bekannter Zusammensetzung maßgebend. Verwendet wurde die übliche anorganische Nährlösung und je 2% des zu untersuchenden organischen Nährstoffes zugesetzt. Das Wachstum erfolgte entweder in der Weise, daß sich submers um das Impfstück ein dichtes Myzel entwickelte, das am Boden festhaftete, oder die über den ganzen Boden des Kulturgefäßes hin verteilten Myzelflocken den Ausgangspunkt für neue Kulturen bildeten, so daß schließlich der ganze Boden von Räschen überdeckt war. Ein Einfluß von Licht oder Dunkelheit konnte nicht festgestellt werden. Die Resultate der Darbietung von Nährstoffen, die ausschließlich als C-Quelle in Betracht kamen, sind aus Tabelle V ersichtlich. Während die mehrwertigen Alkohole nicht angegriffen wurden, trat in allen untersuchten Kohlehydratlösungen, wenn auch teilweise äußerst schwaches Wachstum ein, außer in Saccharoselösungen (der Versuch wurde wiederholt), was um so verwunderlicher ist, als auf Agar mit Saccharose ein gutes Wachstum zu verzeichnen war. In Lösungen der Monosaccharide war das Wachstum durchwegs sehr schwach, was mit dem Wachstum auf den entsprechenden Agarnährböden übereinstimmt, während das

Tabelle V

(Aufgestellt bei mittlerer Zimmertemperatur. Kulturdauer 8 Wochen.)

Anorganische Nährlösung und Zusatz von	Wachstum	Farbe
Mehrwertige Alkohole		
Glycerin	kein Wachstum	—
Erythrit		—
Mannit . .		—
Sorbit . .		—
Kohlehydrate		
Monosaccharide		
Glukose . .	sehr schwach	hellgrün
Fruktose	äußerst schwach	farblos
Galaktose	sehr schwach	hellgrün
Disaccharide		
Saccharose	kein Wachstum	—
Maltose	gutes Wachstum	blaugrün
Laktose		
Polysaccharide		
Dextrin		
Kartoffelstärkekleister		
Inulin (Dragendorff) . .	sehr gutes Wachstum	
Inulin (Kahlbaum, reinst)	gutes Wachstum	farblos bis hellgrün
Zellulose (Filterpapier)		blaugrün

© Verlag Akademie der Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Resultat bei Disacchariden und Polysacchariden ein gutes war. Das beste Wachstum fand sich im Inulin (Dragendorff), das aber als unrein vermutet wurde, weshalb zur Kontrolle ein Purissimumpräparat von Kahlbaum verwendet wurde. Tatsächlich war hier das Wachstum ein viel schwächeres und weniger intensiv grünes. Zellulose wurde in Form des von Schleicher und Schüll für quantitative chemische Untersuchungen hergestellten Filterpapiers in Petrischalen dargeboten, mit der anorganischen Nährlösung durchtränkt (Fig. 3).

In einer weiteren Serie wurden Organika versucht, die bei Weglassung des Ammonnitrats sowohl als N- wie als C-Quelle dienen sollten. (Tabelle VI.)

Tabelle VI.

(Aufgestellt bei mittlerer Zimmertemperatur. Kulturdauer 8 Wochen.)

Anorganische Nährlösung (ohne NH_4NO_3) und Zusatz von	Wachstum	Farbe
Organische Ammoniumsalze		
Ammonazetat ..	kein Wachstum	—
Aminosäuren		
Alanin ..	sehr schwach	farblos
Leucin ..	kein Wachstum	—
Asparaginsäure		—
Asparagin ..		—
Eiweißstoffe		
Pepton (Witte) ..	schwach	farblos

Von den verwendeten Aminosäuren ergab nur Alanin ein schwach positives Ergebnis; Ammonazetat erschien gleichfalls unverwertbar. Das Wachstum des Pilzes im Peptonwasser stimmte überein mit seiner Fähigkeit, Gelatine abzubauen..

Die genauere Untersuchung der N-Ansprüche des Pilzes konnte bis jetzt noch nicht durchgeführt werden infolge der sich ergebenden technischen Schwierigkeiten, die entsprechenden Kohlehydratnährlösungen vollständig N-frei herzustellen. Es scheinen jedenfalls außer anorganischen N-Quellen auch organische für die Deckung des N-Bedarfs brauchbar zu sein.

Wenn wir die Ergebnisse des Wachstums auf festen wie in flüssigen Nährböden überblicken, kommen wir zu dem Resultat, daß *Chlorosplenium aeruginosum* (Oed.) in seinen Nähransprüchen zwar nicht besonders spezialisiert ist, jedoch nicht zu den omnivoren Pilzen gezählt werden darf, wie die Bevorzugung der Kohlehydrate als C-Quelle zeigt, die wohl auch die Nährstoffe des natürlichen Substrates darstellen.

2. Die Reaktion des Nährbodens.

Zur Bestimmung der durch die Reaktion des Nährsubstrates gegebenen Kardinalpunkte des Wachstums und der Untersuchung der Abhängigkeit der Farbstoffbildung von der Reaktion des Nährsubstrates wurde zu 100 cm^3 Inulinnährlösung (Dragendorff) von der bekannten Zusammensetzung je 8·5, 2, 1·5, 1·25, 0·75, 0·25 cm^3 einer 1prozentigen Natronlauge und je 0·25, 1, 2 cm^3 einer 1prozentigen Schwefelsäure zugesetzt. Der Tatsache Rechnung tragend, daß eine bloß qualitative Bestimmung der Reaktion für die Lösung obengenannter Fragen als völlig unzureichend erscheint, wurde die Reaktion der Nährmedien quantitativ durch Bestimmung ihres P_H-Wertes ermittelt. Da durch das Sterilisieren die P_H-Werte Veränderungen erfahren können, wurden die einzelnen Nährlösungen in Kölbchen sterilisiert und ein Teil von ihnen dann für die Kulturen, ein anderer für die P_H-Bestimmung durch die Gaskettenmethode verwendet. Eine Versuchsserie wurde im Licht, die andere unter gleichen Bedingungen im Dunkel aufgestellt, und zwar geimpft am 8. März und nach 10 Wochen Kulturdauer am 18. Mai abgebrochen. Nach 7 Wochen trat keine Änderung mehr ein, der Stand war derselbe wie zu Ende des Versuches (Tabelle VII).

Tabelle VII.

(Aufgestellt bei mittlerer Zimmertemperatur. Kulturdauer 10 Wochen.)

P_H	Wachstumsintensität	Farbe
8·53	O	—
8·24	O	—
7·66	+	farblos
7·21	++	»
6·78	++	»
6·57	+++	hellolivbraun
5·61	+++	olivbraun
5·03	+++	braungrün
4·33	++++	blaugrün
3·26	++++	
2·4	O (+)	— (hellgrün)

Zwischen den im Licht und Dunkel aufgestellten Kulturen ergab sich kein Unterschied mit der Ausnahme, daß bei P_H 2·4 im Licht kein Wachstum zu bemerken war, während im Dunkeln noch schwaches hellgrünes Wachstum in kleinen Räschen eintrat. Daß dies auf eine spezifische Wirkung der Dunkelkultur zurückzuführen ist, wäre wohl kaum anzunehmen. Bemerkenswert ist, daß bei P_H 7·66 (also schwach alkalischer Reaktion) ein sehr schwaches Wachstum erst nach 7 Wochen zu sehen war, bei P_H 4·33 und 3·26 die ersten Wachstumsanfänge bereits nach 10 Tagen sich einstellten, zu einer Zeit, in welcher bei den anderen Kulturen noch kaum

© Verlag Akademie der Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Wachstum auftrat. Aus der Tabelle ergibt sich ferner, daß die Farbstoffbildung mit der Wachstumsintensität parallel geht, d. h., daß um so schwächer das Wachstum ist, desto mehr auch die Grünfärbung schwindet. Das Optimum von Wachstum und Farbstoffbildung scheint um P_H 3·2—4·3 zu liegen, während das Minimum nach der sauren Seite bei P_H 2·4, nach der alkalischen Seite um den Neutralitätspunkt herum zu liegen scheint. Die optimale Färbung ist tiefblaugrün und führt über eine bräunlichgrüne und olivgrüne Färbung zu vollständiger Farblosigkeit.

Wenn wir auch annehmen können, daß sich die hier an einem bestimmten Fall festgestellte Wirkung der Reaktion auf Wachstum und Farbstoffbildung verallgemeinern läßt, so mag dennoch nicht bestritten werden, daß sicherlich im einzelnen Verschiebungen in der Wirkungsweise je nach dem Substrat und anderen äußeren Einflüssen möglich sind. Jedenfalls darf die Komponente des Einflusses der Reaktion des Substrates in den verschiedenen Nährböden nicht unberücksichtigt bleiben, insbesondere bei festen Nährböden, bei denen die Reaktionsverhältnisse meist nicht leicht feststellbar sind. Viele Verfärbungen, die man geneigt ist, auf die spezifische Wirkung eines Nährstoffes zurückzuführen, lassen sich letzten Endes vielleicht in einzelnen Fällen durch die verschiedene Reaktion des Mediums erklären.

3. Der Sauerstoffmangel.

Das halbuntergetauchte Wachstum des Pilzes in Agar- und Gelatinenährböden ließen die Vermutung aufkommen, daß anaerobe Bedingungen bevorzugt werden. Durch einen Vorversuch konnte diese Vermutung nicht bestätigt werden. Es wurde eine Glukosegelatine am Grunde einer Eprouvette geimpft, dann verflüssigte Gelatine darüber geschichtet, wobei abgetrennte Myzelflocken in diese aufstiegen und nun entwickelten sich aus den in der erstarrten Gelatine verteilten Myzelflocken kleine Kulturen, welche in derselben Zeit um so größer waren, je näher sie sich der Oberfläche befanden. Zur genaueren Untersuchung wurde je ein flüssiger Inulinnährboden, ein Glukoseagar und eine Glukosegelatine geimpft und in einen luftdicht verschließbaren Vakuumexsikkator gebracht, der mit alkalischer Pyrogallussäure (40% Pyrogallussäure + 20% KOH) beschickt worden war und evakuiert wurde. Unter diesen anaeroben Bedingungen, welche alle Wochen mittels eines Manometers kontrolliert wurden, blieben die Nährböden 11 Wochen, ohne daß irgendwelche Wachstumsanzeichen auftraten. Dann wurde der Versuch abgebrochen und die Kulturen aerob unter sonst gleichen Bedingungen aufgestellt. Während auf dem Agar- und Gelatinenährboden kein Wachstum zu bemerken war, begann nach 14 Tagen im Inulin farbloses Wachstum und nach einem Monat hatten sich farblose bis braune Räschen von etwa 2 *cm* Durchmesser entwickelt. Eine 4 Wochen alte Kultur auf Glukosegelatine und eine 10 Wochen alte Kultur auf Glukoseagar, die bisher unter aeroben Bedingungen gewachsen waren, wurden

unter anaerobe Bedingungen gebracht und dort einen Monat belassen. Das Wachstum hatte keinerlei Fortschritte gemacht und die grüne Agarkultur hatte sich braun verfärbt.

Diese Versuche ergeben eindeutig, daß sich der Pilz nur dann entwickelt, wenn ihm Sauerstoff zur Verfügung steht. Ist dies nicht der Fall, so braucht wenigstens in einer gewissen Zeitdauer, wie es sich gezeigt hat, noch keine solche Schädigung einzutreten, daß der Pilz seine Lebensfähigkeit vollständig einbüßt.

4. Die Temperatur.

Um bei der Kultur dem Pilze die richtigen Lebensbedingungen zu schaffen, war es notwendig, die Kardinalpunkte des Wachstums in seiner Abhängigkeit von der Temperatur zu bestimmen. Hand in Hand damit ging die Untersuchung der Frage, ob auch die Farbstoffbildung bei verschiedenen Temperaturen eine verschiedene ist, in welcher Hinsicht schon im Laufe der Kulturversuche Beobachtungen gemacht werden konnten. So zeigte sich auf einem Inulinagar in einem Thermostaten bei 25° C rein farbloses, in einer Dunkelkammer, deren Temperatur zwischen 10°—16° C schwankte, braunes Wachstum. Ferner waren die oberflächlichen Hyphen auf einem Pflaumendekoktagar im Thermostaten bei 25° C hellgrün gefärbt, während sie bei niederer Temperatur dunkelgrün gefärbt erschienen. Genauere diesbezügliche Versuche und betreffs des Wachstums überhaupt wurden in einem Thermostaten angestellt, der die Möglichkeit einer Benützung von acht verschiedenen Temperaturstufen bot.[1] Die Schwankungen der Temperaturen betrugen während einer zweimonatigen Versuchsdauer höchstens 2° C.

In den folgenden Tabellen sei der Genauigkeit halber das Temperaturminimum und -maximum im Laufe der Versuchsdauer angegeben.

Übereinstimmend bei allen drei Nährböden finden wir in Versuch I (Tabelle VIII) bezüglich der Wachstumsintensität ein Optimum in der Temperaturstufe 18°—19° C und von hier mit sinkender (Glukoseagar Nr. 3 fällt aus der Reihe heraus) und steigender Temperatur Wachstumsabnahme bei einem Maximum von 28° C. Darüber hinaus findet kein Wachstum mehr statt. Die Intensität der Farbstoffproduktion stimmt nicht ganz überein mit der Wachstumsintensität, indem die dunkelsten Töne bei 7°—9° C auftreten und von da mit steigender Temperatur an Helligkeit gewinnen, bis ab 25° C vollständig farbloses Wachstum eintritt. Als die Kulturen der 7. Temperaturstufe in die 2. Temperaturstufe (14°—16° C) gebracht

---

[1] Diese Versuche wurden im Institut für Technische Biochemie und Mikrobiologie der Technischen Hochschule in Wien ausgeführt, dessen Vorstand Herr Prof. Dr. H. Zikes mir in entgegenkommender Weise die Benützung des großen Thermostaten sowie des Eisschrankes »Frigidaire« gestattete, wofür ich meinen ergebensten Dank auszusprechen mir erlaube. Ferner bin ich Herrn Prof. Dr. A. Janke und Herrn Dr. H. Lacroix an diesem Institut für ihre Unterstützung zu Dank verpflichtet.

© Verlag Akademie der Wissenschaften, Wien; download unter www.biologiezentrum.at

wurden, stellte sich beim Buchenholzdekokt nach 3 Wochen beginnendes Wachstum ein mit demselben Endergebnis wie bei den Kulturen, die von Anfang an hier aufgestellt waren, während auf dem Glukoseagar kein Wachstum zu bemerken war.

Tabelle VIII (Versuch I).

(Geimpft am 22. Dezember; d = Durchmesser der Kultur; Stand am 10. Februar.)

Nr. der Temp.-stufe	Temperatur-stufe	Glukoseagar	Glukosegelatine	Buchenholz-dekokt
1.	7°—9° C	dunkelblaugrün $d = 4$ *mm*	dunkelblau—gelbl.-grün, $d = 2$ *cm*	blaugrüne Gallert-klumpen am Boden angewachsen $d = 1/2$ *cm*
	14°—16° C	etwas heller grün $d = 3$ *mm*	hellgelbgrün $d = 3$ *cm*	wie 1., $d = 2$ *cm*
3.	18°—19° C	wie 2., $d = 4$ *mm*	hellgelbgrün $d = 4$ *cm*	heller grün als 1., sonst wie 1., $d = 2$ *cm*
4.	20°—22° C	heller grün wie 3., $d = 4$ *mm*	weißlich (mit Spur grün)[1] $d = 3$ *cm*	wie 3., am Boden nicht angewachsen $d = 2$ *cm*
	25°—26° C	farblos $d = 4$ *mm*	farblos $d = 2$ *cm*	wie 3., $d = 1 \cdot 5$ *cm*
6.	26°—28° C	farblos $d = 3$ *mm*	—	farblos, sonst wie 5., $d = 1$ *cm*
7	29°—32° C	kein Wachstum	—	kein Wachstum
8.	37°—38° C		—	

[1] Auf Grund der Temperatur von vornherein flüssig.

Die Buchenholzdekoktkulturen wurden sämtlich ausgeschaltet, da sich seit geraumer Zeit keine Änderung ergeben hatte. Das Wachstumsoptimum der Agar- und Gelatinekulturen verschob sich im Laufe der weiteren Kulturdauer nach unten in einem Maß, das durch die allgemeine Temperatursteigerung von je 1° C pro Temperaturstufe nicht zu erklären ist. Alle Gelatinekulturen ab Temperaturstufe 2 zeigten nach oben zu, proportional der Temperatursteigerung, raschere Verflüssigung und Zerfallserscheinungen, während nach 5 Monaten die Gelatinekultur der untersten Stufe noch keine Spur einer Verflüssigung aufwies.

Die Resultate des Versuches II (Tabelle IX) entsprechen ziemlich denen des Versuches I: Das Wachstumsoptimum liegt hier bei 14°—16° C, die blaugrüne Farbe ist am intensivsten bei 8°—10° C. Nach einem weiteren Monat waren die Kulturen in der Temperaturstufe 5 submers ebenfalls etwas bräunlich, die aus der Flüssigkeit herausragenden Teile aber schneeweiß und stark guttierend.

Zur Feststellung des Wachstumsminimums wurde ein dritter Versuch im Eisschrank aufgestellt. (Tabelle X.)

Tabelle IX (Versuch II).

(Geimpft am 28. Jänner; Stand am 23. April.)

(Nährboden: Inulin [Dragendorff] flüssig.)

Nr. der Temp.-stufe	Temperatur-stufe	Farbe und Art des Wachstums	Wuchsform	Wachstums-intensität
1.	8°—10° C	blaugrün, am Boden nicht festgewachsen	zusammen-hängende Aggregate	++
	14°—16° C	blaugrün (mit Stich ins Bräunliche), am Boden festgewachsen	Flocken	+++
	18°—19° C	braungrün, am Boden nicht festgewachsen		++
4.	19°—21° C	braun, am Boden nicht festgewachsen	knollig	++
	26°—27° C	farblos, am Boden nicht festgewachsen		+

Auf einer gleichzeitig geimpften Glukosegelatine, die als Kontrollkultur in der Temperaturstufe 2 aufgestellt wurde, entwickelte sich der Pilz bereits nach 14 Tagen.

Tabelle X (Versuch III).

(Kulturdauer 6 Wochen.)

Nr. der Temp.-stufe	Temperatur-stufe	Glukoseagar	Glukosegelatine	Holz-dekokt	Inulin flüssig
1.	−2° bis −1° C	kein Wachstum	farblos $r = 3$ *mm*	farblos	farblos
	0° bis −2° C	—	farblos $r = 2$ *mm*	—	—

Nach den ausgeführten Versuchen stellt *Chlorosplenium aeruginosum* (Oed.) den Typus eines tiefere Temperaturen liebenden Pilzes dar mit einem Minimum von zirka 0° C, einem Maximum von 28° C und einem nicht näher bestimmbaren Optimum zwischen 14°—18° C, Temperaturen, wie sie der Pilz in der Natur findet. Die Farbe der Kulturen wird bei steigender Temperatur heller, beziehungsweise zu einem Braungrün und ab 26° C unterbleibt die Farbstoffbildung gänzlich.

5. Licht und Dunkelheit.

Da bei den meisten Versuchen die Nährböden unter sonst gleichen Bedingungen im Licht und Dunkel aufgestellt worden waren, konnte das Vorhandensein oder Fehlen von Unterschieden zwischen

© Verlag Akademie der Wissenschaften, Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Licht- und Dunkelkultur von Anfang an jeweils festgestellt und bereits an den betreffenden Stellen angegeben werden. Dabei ergaben sich keinerlei Beziehungen zu Licht und Dunkelheit in allen flüssigen Nährmedien, auf Agarnährböden, bei den Holzkulturen und der Kultur auf gedämpftem Reis; wohl aber waren solche eindeutig bei einigen Gelatinenährböden zu finden. Die Unterschiede betrafen hauptsächlich solche Nährböden, bei denen sofort Verflüssigung eintrat, und bezogen sich auf die Pilzfärbung und die Färbung der verflüssigten Gelatine oder, wenn es sich um Nährböden handelte, die keine Verflüssigung zeigten, bestanden sie darin, daß das Altersstadium in Form der Verflüssigung im Dunkel früher eintrat als im Licht. Zur Erläuterung des ersten Falles sei auf die bei der Besprechung des Gelatinewachstums zusammengestellten Ergebnisse hingewiesen (Tabelle IV).

Ein Beispiel für den zweiten Fall bietet der folgende Versuch (Tabelle XI), in dem auch die Wirkung des Lichtes verschiedener Spektralbezirke durch Verwendung von mit Kaliumbichromat-, beziehungsweise Kupferoxydammoniaklösung gefüllten Senebierschen Glocken geprüft wurde.

Tabelle XI.

(Nährboden: Glukosegelatine; Kulturdauer 10 Wochen; mittlere Zimmertemperatur.)

Kulturbedingung	Wirkung auf die Gelatine
Licht:	keine Verflüssigung.
Dunkel:	Verflüssigung, Gelatine braun verfärbt.
Rotes Licht:	keine Verflüssigung.
Blaues Licht:	Verflüssigung, Gelatine braun verfärbt.
(Zwei Wochen später zeigten sämtliche Kulturen Verflüssigung).	

Über das Wesen des Einflusses von Licht und Dunkelheit können wir nur Vermutungen hegen. Die Wirkung des Lichtes ist wahrscheinlich spezifisch photochemischer Natur. Die Erklärung Küsters, daß sie nur eine mittelbare sei, indem durch das Licht die Transpiration gefördert und damit der Stoffwechsel wesentlich beeinflußt wird, kommt hier wohl kaum in Frage, da der Pilz der Hauptsache nach untergetauchtes Wachstum zeigt und daher der Transpiration wenig Bedeutung zukommt.

Anhang.

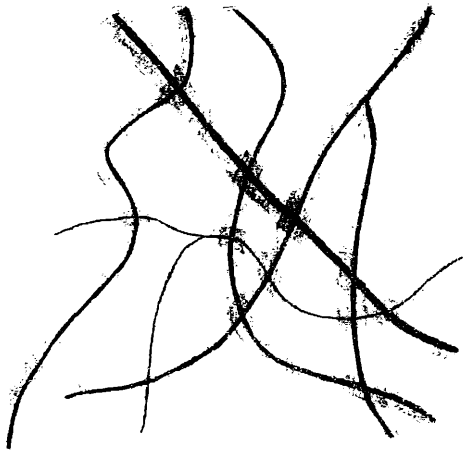
Einige morphologische Eigentümlichkeiten.

Mit der Morphologie von *Chlorosplenium aeruginosum* (Oed.) hat sich zuletzt Vuillemin eingehend beschäftigt und dabei sein Hauptaugenmerk auf die Lokalisation des Farbstoffes gelenkt. Er konnte feststellen, daß es sich hiebei um keine Membranfärbung der Hyphen handelt, sondern daß die Hyphen außen mit Farbstoff

inkrustiert sind. Durch eigene Beobachtungen konnte sowohl das Vorkommen einer homogenen (Fig. 6) wie einer unterbrochenen, aus amorphen Farbstoffklumpen bestehenden Inkrustation bestätigt werden. Sehr schön zeigten dies Hyphen aus einem flüssigen Inulinnährboden, wo häufig die Inkrustation durch sphäritähnliche Farbstoffaggregate auffiel (Fig. 4 und Fig. 5).

Eine besondere Wachstumseigentümlichkeit des Pilzes stellt das häufige Auftreten von Gemmen in einigen Nährsubstraten, vor allem in Agarnährböden, dar.

Von großem Interesse ist die Beobachtung, daß der Pilz im Holzdekokt Schleim produziert, der, wie durch das Einlegen der Hyphen in Tusche und durch Färbungen nachgewiesen wurde, in Form einer Scheide die Hyphen umgibt (Textfig. 1). Bei scheinbar älteren Hyphen zeigt die Schleimscheide eine körnige Struktur und



Textfig. 1.

Hyphen von *Chlorosplenium aeruginosum* (Oed.) mit Schleimscheiden, gefärbt mit Delafields Hämatoxylin. Vergr. 280.

speichert viel mehr Farbstoff, was vielleicht als eine Fällungserscheinung zu deuten ist. Zur Sichtbarmachung der Schleimscheiden wurden verschiedene Reagentien und Färbemittel auf ihre Verwendbarkeit geprüft.

Keine Färbung ergaben Chlorzinkjod, Jodjodkalium, Mucikarmin, Magdalarot (auch nicht nach vorheriger Behandlung mit Alkohol und Bleiazetat), schwache Färbung wässerige Methylenblaulösung, gute Färbung mäßig konzentrierte Methylviolettlösung in 30% Alkohol, Safranin, Rutheniumrot, Löfflers Methylenblau, Ziehls Karbolfuchsin und sehr gute Färbung Delafields Hämatoxylin und wässerige Gentianaviolettlösung (mit Karbolzusatz).

Die Schleimbildung im Holzdekokt war schon makroskopisch zu erkennen, indem die am Boden festsitzenden kugelförmigen Kulturen gallertige Beschaffenheit hatten. Die in allen sonstigen flüssigen Medien kultivierten Hyphen zeigten keine Ausbildung von Schleim-

© Verlag Akademie der Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

scheiden, wie die Färbungsversuche mit Delafields Hämatoxylin ergaben. In Schnitten von Eichenholzreinkulturen konnten Schleimscheiden durch Färbung bei den in den Gefäßen wuchernden Hyphen nachgewiesen werden. Schwächere Schleimbildung zeigten die Hyphen im Lärchenholz.

Aus den durchgeführten Färbeversuchen ist also zu ersehen, daß die Schleimbildung vom Substrat abhängig und in ihrer Verbreitung eine sehr beschränkte ist.

II. Der Farbstoff.

1. Historisches.

Fast alle Autoren, die sich mit dem grünfaulen Holz beschäftigten, widmeten sich mehr oder weniger der Untersuchung des Farbstoffes, vor allem auch deshalb, da dieser infolge seiner Beständigkeit vielleicht auch für praktische Zwecke verwertbar schien. Bei Döbereiner ist es, der Methode der Darstellung nach zu schließen, zweifelhaft, ob er mit dem Farbstoff in seiner ursprünglichen Form gearbeitet hat. Gümbel extrahierte den Farbstoff mit Alkalien und fällte ihn daraus mit Säuren; er gab ihm den Namen Ioxylinsäure. Bley, der ihn auf demselben Weg gewann und auch eine Analyse versuchte, nannte ihn Xylochlorsäure. Dieselbe Bezeichnung (acide xylochlorique) gab dem Farbstoff Fordos, welcher ihn aus dem Holz durch Chloroform auszog. Er fand ihn unlöslich in Wasser, Äther, Benzin, Schwefelkohlenstoff, kaum löslich in Alkohol und löslich in Chloroform, Eisessig, konzentrierter Schwefel- und Salpetersäure. Aus der Chloroformlösung des Farbstoffes bekam er mit verdünntem Ammoniak eine in beiden Flüssigkeiten unlösliche Ammoniumverbindung. Interessant ist, daß Fordos aus dem Holz auch einen roten Farbstoff gewann, der sich bei sonst gleichen Löslichkeitsverhältnissen von dem grünen Farbstoff durch seine Löslichkeit in Alkohol unterschied, wodurch er von diesem getrennt werden konnte. Crum-Brown fällte den Farbstoff aus einer Salpetersäurelösung mit Wasser und fand an diesem dieselben Löslichkeitsverhältnisse wie Fordos. Einen zweiten grünen Farbstoff will Rommier aus dem Holz mit verdünnten Alkalien extrahiert haben, welcher sich von dem andern dadurch unterschied, daß er sich in Wasser mit schön grünblauer Farbe löste. Er gab ihm daher einen anderen Namen, nämlich Xylindein. Dieser angeblich neue Farbstoff gab mit Kalk und Magnesia in Wasser unlösliche grüne Lacke und ließ sich durch Glukose in alkalischer Lösung reduzieren. Als seine Zusammensetzung wurde angegeben: $C = 50 \cdot 23\%$, $H = 5 \cdot 33\%$, $N = 2 \cdot 63\%$. Rommier blieb mit der Entdeckung seines zweiten Farbstoffes vereinzelt. Nach ihm untersuchte Prillieux den grünen Farbstoff des Holzes von den Eigenschaften der »Xylochlorsäure« in einer Chloroformlösung spektroskopisch, wobei die Chloroformlösung als schwach gelbgrün fluoreszierend angegeben wird. Die letzte Untersuchung des grünen Farbstoffes stammt von Liebermann. Obwohl die Eigenschaften seines Farbstoffes mit denen des »Xylindein« Rommiers sich nicht deckten, sondern denen der »Xylochlorsäure« entsprachen, nannte er ihn dennoch gleichfalls Xylindein, wegen der Farbe und dem Aussehen der Kristalle, welche er durch Extraktion mit Phenol erhielt und die dem sublimierten Indigo ähnlich sahen. Den Weg zur Kristallisation gibt er folgendermaßen an (p. 1103): »Man löst die aus Phenol (mit Alkohol oder Äther) gefällte und auf einer Porzellanschale abgesaugte Substanz in möglichst wenig, 50° C warmem Phenol wieder auf und filtriert durch einen Warmwassertrichter. Die allmählich sich ausscheidenden Kristalle sind kleine, stark kupferglänzende, vierseitige Blättchen.« Als neues Lösungsmittel wurde außer Phenol noch Anilin angegeben. Nach Liebermann ist die Zusammensetzung des Farbstoffes $C = 65 \cdot 48\%$, $H = 4 \cdot 71\%$, $N = 1\%$, wobei der Stickstoffgehalt als akzessorisch angenommen wird. Spätere Autoren beschränkten sich darauf, die Literatur zu zitieren, ohne jedoch selbst neue Untersuchungen anzustellen (Zopf, Rehm, Vuillemin, Rupe, Zellner). Vuillemin schlägt vor, den Farbstoff Mycochlorin zu

nennen, um die Herkunft vom Pilz zum Ausdruck zu bringen. Da sich aber in der Literatur die Bezeichnung Xylindein eingebürgert hat, wollen wir dabei bleiben, wenn sie auch nicht sehr glücklich gewählt erscheint.

2. Eigene Untersuchungen.

Da im Gegensatz zu den früheren Untersuchungen, in denen der Farbstoff aus dem grünen Holz extrahiert wurde, von den Kulturen her reines, mit Farbstoff inkrustiertes Pilzmaterial zur Verfügung stand, konnten an diesem die in der Literatur angegebenen Löslichkeitsverhältnisse und sonstige Eigenschaften des Xylindeins eine Nachprüfung und einige Ergänzung erfahren. Es soll gleich an dieser Stelle erwähnt werden, daß ein zweiter Farbstoff im Sinne Rommiers nicht gefunden werden konnte. Das Pilzmaterial wurde aus den flüssigen Inulinnährböden (Dragendorff) entnommen, in denen, wie schon erwähnt, prächtiges blaugrünes Wachstum eintrat, mit destilliertem Wasser ausgewaschen, in einer Porzellanschale getrocknet und in Parallele mit pulverisiertem, grünem Holz extrahiert. Die Löslichkeitsverhältnisse sind aus nachstehender Tabelle XII ersichtlich.

Abweichungen in der Löslichkeit des Pilzmaterials gegenüber der Holzlöslichkeit ergaben sich keine. Einzelne geringe Unterschiede sind wohl durch hinzukommende Lösung von im Holz befindlichen Substanzen zu erklären. Als neue Lösungsmittel konnten festgestellt werden Essigsäureäthylester, Aceton, Nitrobenzol, Pyridin und Chinolin. Dem Knochenöl kommt wegen der sehr geringen Löslichkeit beim Erwärmen keine praktische Bedeutung zu und es erwies sich auch für eine bei den Flechtenfarbstoffen angewandte Kristallisationsmethode (siehe Molisch) als unbrauchbar.

Daß das Xylindein sauren Charakter hat, indem es in Alkalien unter Salzbildung mit gelblichgrüner bis brauner Farbe löslich ist und aus der Lösung mit Salzsäure gefällt werden kann, konnte bestätigt werden. Ebenso wurde die Reduktion, welche Rommier für seinen Farbstoff angibt, an grünem Pilzmaterial im Reagenzglas mit Glukose in alkalischer Lösung durchgeführt. Die Hyphen nahmen dabei eine orangegelbe Farbe an, die mit Perhydrol wieder zu Grün umgewandelt werden konnte. Durch Zinkstaub und Salzsäure wurde ein gelbes Reduktionsprodukt erzielt, das sich ebenfalls mit Perhydrol oxydieren ließ. Daß der Farbstoff ungemein leicht reduziert wird, geht daraus hervor, daß bei der Lösung des Farbstoffes aus Pilzmaterial mit Phenol in einer Schale sich oberflächlich rote Häute bildeten, welche, wahrscheinlich durch die schwach reduzierende Wirkung des Phenols entstanden, bei der Behandlung mit Perhydrol sich wieder grün färbten. Die geringen Verschiedenheiten in den Farbentönen bei der Reduktion stellen wahrscheinlich verschiedene Reduktionsstufen dar. Als brauchbare Fällungsmittel kamen in Übereinstimmung mit den Literaturangaben Alkohol und Äther für Phenol und Chloroform und Wasser für Salpetersäure in Betracht. Ob das

© Verlag Akademie der Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Tabelle XII.

Lösungsmittel	Holzpulver	Pilzmaterial
Destilliertes Wasser ..	farblos (nach Kochen grüne Suspension)	farblos
Verwendete anorganische Nährlösung .	farblos	
1% Natronlauge .	später braun	später braun
konz. .		
1% Natriumkarbonat. .		
konz. .		
1% Ammoniak.. ..	olivgrün bis braun	olivgrün bis braun
konz. .		
10% Schwefelsäure .	farblos	farblos
konz. .	braun, später braunschwarz	grasgrün, später braun
10% Salzsäure.. ..	farblos	farblos
konz. ..	gelbgrün, später braun	gelbgrün, später braun
10% Salpetersäure .	gelb	farblos
konz. ..	blaugrün	blaugrün
Chloroform .		
Tetrachlorkohlenstoff .	farblos	farblos
Schwefelkohlenstoff .	farblos (nach längerer Einwirkung schwach gelblich)	
Methylalkohol ..	farblos (nach längerer Einwirkung schwach gelblich)	
Äthylalkohol (10%, 30%, 50%, 70%, 96%). ..	gelblich	
Amylalkohol .	farblos	
Diäthyläther ..		
konz. Essigsäure ..	blaugrün	blaugrün
Essigsäureäthylester ..	schwach blaugrün	schwach blaugrün
Knochenöl	farblos (beim Erwärmen erst schwach blaugrün, dann gelbgrün bis braun, beim Erkalten wieder Verfärbung in umgekehrter Reihenfolge)	farblos (beim Erwärmen gleiches Verhalten wie Holzpulver)
Aceton .	blaugrün	blaugrün
Benzol .. .	farblos	farblos
Xylol .		
Nitrobenzol .	blau	blau
Anilin.. .	blaugrün	blaugrün
Phenol .		»
Terpineol .	farblos (nach längerer Einwirkung schwach bräunlich)	farblos
Pyridin.. ..	blaugrün	blaugrün
Chinolin.. .		

Fällungsprodukt aus der Salpetersäure den unveränderten Farbstoff darstellt, was man aus dem Nichteintreten einer Verfärbung schließen kann, möge dahingestellt bleiben.

Nachgeprüft wurde auch das spektroskopische Verhalten des Xylindeins in einer Chloroformlösung und dabei die Angaben Prillieux's bestätigt; nur dürfte außer den drei Absorptionsstreifen im Rot, Orange und Gelb noch der äußerste Teil des Violett absorbiert werden. Eine Fluoreszenz der Chloroformlösung konnte nicht festgestellt werden.

Besonderes Augenmerk wurde auf das mikrochemische Verhalten des Farbstoffes gelenkt. So konnten die meisten der oben angeführten Lösungsmittel auf dem Objektträger an Pilzhyphen und Holzpulver durchprobiert und außerdem in Anlehnung an Liebermann eine Methode ausfindig gemacht werden, um den Farbstoff zur Mikrokristallisation zu bringen. Bei der Verwendung von Holzpulver bringt man von diesem möglichst viel unter das Deckglas und löst mit möglichst wenig Phenol auf (verwendet wurde das unter der Bezeichnung Acidum carbolicum liquefactum in den Handel gebrachte Phenol). Durch langsames Einwirkenlassen von Alkohol (in einer Alkoholkammer) entstehen frühestens nach 2 Stunden zahlreiche blaugrüne, sphäritähnliche Farbstoffaggregate, insbesondere am Rande des Deckglases und seltener bräunliche, vierseitige, rhombische Kristalle, die durch weitere Einwirkung von Alkohol langsam oder beim Durchwaschen mit Alkohol sofort gleichfalls blaugrüne Farbe annehmen. Die braunen Kristallprodukte dürften eine labile Verbindung mit dem Phenol darstellen, welche durch die Alkoholeinwirkung eine Entmischung erfahren. Der Umstand, daß das Braun bei Perhydrolbehandlung keine Umfärbung in Grün erleidet, spricht gegen die Annahme eines Reduktionsproduktes. Schöner und reichlicher erhält man die Kristalle (Fig. 8), wenn man Holzpulver in größerer Menge mit wenig Phenol versetzt, damit die Lösung eine möglichst konzentrierte oder übersättigte ist, und dann einen Tropfen der blaugrünen Lösung auf den Objektträger bringt, mit dem Deckglas bedeckt und in der angegebenen Weise verfährt. Die braunen Kristalle setzen sich auch aus der übersättigten Phenollösung ab, wenn man diese längere Zeit stehen läßt. Die Methode läßt sich in gleicher Art bei grünen Pilzhyphen anwenden, welche auf einem Objektträger angetrocknet sind. Bringt man auf diese einen Tropfen Phenol, so kristallisiert der Farbstoff zum Teil bereits in der Hyphenmasse an den Hyphen in bräunlichen oder grünen Kristallen und Kristallaggregaten aus, während die erwähnten braunen und später grün werdenden vierseitigen Kristalle bei langsamer Einwirkung von Alkohol außerhalb der Hyphen entstehen. Nach der Lösung des Farbstoffes durch Phenol erscheinen die Pilzhyphen rot gefärbt; mit Phenol kann die rote Farbe in eine grüne verwandelt werden. Sowohl die aus dem Holz wie die aus dem Pilzmaterial erzielten Kristalle und Kristallaggregate erfahren beim Abdunstenlassen des Alkohols an der Luft eine Umkristallisation zu oft schönen nadeligen

© Verlag Akademie der Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Drusen und Kristallformen und verfärben sich dabei zum Teil, soweit sie im Phenol liegen, rotbraun. Ein Durchwaschen mit Alkohol verursacht wieder eine Umfärbung in Grün.

Wenn man Holzpulver oder noch besser Pilzmaterial auf dem Objektträger mit Nitrobenzol versetzt und die Lösung unter dem Deckglas eintrocknen läßt, bleibt der Farbstoff am Deckglasrand in Form von trichitischen und peitschenförmigen Bildungen zurück. Eine Alkoholeinwirkung auf Nitrobenzollösungen führt zu einer Rotfärbung, beziehungsweise zum Ausfallen roter Flocken.

Das langsame oder rasche Eintrocknenlassen von Chloroform-, Essigsäure-, Salpetersäure- und Anilinlösungen des Farbstoffes ergab bloß Schlieren- und Gerinselbildungen und war daher zur Erzielung von Kristallen unbrauchbar. Ähnliches zeigte auch die langsame Einwirkung von Alkohol auf Chloroform- und Essigsäurelösungen.

Auf dem Objektträger läßt sich an Pilzhyphen auch die Verfärbung mit Alkalien in Gelbgrün und Braun durchführen und das Grün sich beliebig oft mit Säure wieder regenerieren. Das Xylindein ist also ein Indikator für Alkali, ähnlich wie es Bessey bei *Fusarium*-Farbstoffen oder Wehmer bei seinen *Penicillium*-Pigmenten festgestellt hat.

Versucht wurde auch mit grünem Pilzmaterial eine Mikrosublimation auf dem Objektträger mit Glasring, jedoch mit negativem Erfolg. Auch die Sublimationsversuche im luftverdünnten Raum im Mikrosublimationsapparat (Klein-Werner) bei 100°, 150°, 200° und 250° C hatten dasselbe negative Ergebnis.

Bezüglich der Natur des Farbstoffes, die, wie schon eingangs erwähnt, noch nicht geklärt ist, ließen sich auf mikrochemischem Wege keinerlei Anhaltspunkte gewinnen. Hier müßten genauere chemische Untersuchungen einsetzen und an einer größeren Menge von Material durchgeführt werden.

Anhang.

Der Farbstoff in seinen Beziehungen zum Substrat.

Die Umwandlungen der grünen Pilzhyphen in braune mit Hilfe von Alkalien bringen das erwähnte Vorkommen von braunen Modifikationen des Farbstoffes unter gewissen Kulturbedingungen in Erinnerung. So konnte auf festen Inulinnährböden farbloses bis braunes Wachstum des Pilzes festgestellt werden. Eine braune Myzelflocke auf den Objektträger gebracht, ergab mit Salzsäure eine Blaugrünfärbung, die mit Ammoniak wieder in eine braune verwandelt werden konnte. Kulturen aus flüssigen Inulinnährböden zeigten bei steigendem P_H eine Umfärbung von Grün über Olivgrün in Braun bis zur vollständigen Farblosigkeit. Während bei den farblosen Hyphen durch Säurebehandlung keine Färbung auftrat, wurde auch hier bei den olivgrünen und braunen Hyphen eine Umwandlung in Grün erzielt. Dasselbe zeigte sich bei Pilzhyphen, die infolge der Kultur in höheren Temperaturen braun gefärbt waren. Jedoch trat

hier wie in den vorhergenannten Fällen auch eine Blaufärbung der braunen Hyphen mit Perhydrolbehandlung ein. Ob das dabei entstandene grüne Produkt unbedingt den ursprünglichen Farbstoff darstellen muß oder ob es nicht auch ein grüngefärbtes Oxydationsprodukt des betreffenden Salzes sein kann, ist eine Frage für sich, die nur bei Kenntnis der Natur des Farbstoffes gelöst werden kann.

Daß für die Färbungen des Pilzes verschiedene Stoffwechselvorgänge, welche vom Substrat und anderen äußeren Einflüssen abhängig sind, verantwortlich gemacht werden müssen, ist klar. Über die Art der Stoffwechselvorgänge aber, welche den Farbstoff, dem wir nur eine exkretorische Bedeutung zuschreiben, zu modifizieren imstande sind, sind wir nur auf Vermutungen angewiesen. Eine Möglichkeit der Entstehung von Braunfärbung bestünde in der Salzbildung mit dem bei der Desaminierung der Aminosäuren im Laufe des Eiweißabbaues freiwerdenden Ammoniak, so daß wir es dann mit einer Ammoniumverbindung des Farbstoffes zu tun hätten. So trat in flüssigen Inulinnährböden, in denen der Pilz schön blaugrünes Wachstum aufwies, stets nach einer gewissen Kulturdauer eine bräunliche Verfärbung der Myzelien ein, mit gleichzeitigem Beginn von Verfallserscheinungen. Es liegt nun nahe, anzunehmen, daß damit der Zeitpunkt erreicht war, in dem nach dem Aufbrauch der Kohlehydrate ein verstärkter Eiweißabbau, verbunden mit einer gesteigerten Ammoniakproduktion sich einstellte, die zu einer Braunfärbung der grünen Hyphen und weiter zur Selbstvergiftung führte. In ähnlicher Weise wäre vielleicht die Braunfärbung der verflüssigten Gelatine zu erklären durch Anreicherung von Ammoniak bis zur Selbstvergiftung. Auch in dem angeführten Falle der verschiedenen P_H-Wirkung könnte die Verfärbung auf eine gesteigerte Ammoniakabspaltung zurückzuführen sein, da ja sicher der gesamte Stoffwechsel durch die geänderten Lebensbedingungen in ganz andere Bahnen gelenkt ist. Wenn diese Annahme richtig ist, müßte sich die gesteigerte Ammoniakproduktion mikrochemisch nachweisen lassen. Dies geschah durch die Methode der Mikrodestillation von Klein-Steiner mit Dinitro-α-Naphtol, indem das Ammoniak durch eine 5prozentige Soda-Kochsalzlösung abgespalten wurde. Etwa $^1/_2$ *mg* grünes Pilzmaterial aus einer Kultur mit P_H 3·2 ergab Ammoniak in Spuren (zirka 0·5 γ), während aus derselben Menge olivbraunen Pilzmaterials aus einer Kultur mit P_H 5·6 Ammoniak in der Quantität 0 — + (= zirka 1 γ) nachgewiesen werden konnte. Es soll jedoch nicht verschwiegen werden, daß bei demselben Nährboden in einem anderen Fall, in dem um so eher die braune Farbe auf eine gesteigerte Ammoniakproduktion zurückgeführt werden müßte, nämlich bei höherer Temperatur, die entgegengesetzten Resultate gewonnen wurden: bedeutend mehr Ammoniak aus den grünen Hyphen der bei 8° bis 10° C aufgestellten Kulturen als aus den braunen Hyphen der bei 19° bis 20° C aufgestellten Kulturen.

Eine zweite Möglichkeit der Umfärbung des Grün kann durch einen Reduktionsprozeß gegeben sein. Ein interessantes Beispiel

© Verlag Akademie der Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

dafür bot die Agarkultur, die sich unter anaeroben Bedingungen rotbraun verfärbt hatte (siehe p. 15) und bei der einen Tag, nach dem sie wieder in aerobe Bedingungen gebracht wurde, die ursprüngliche Grünfärbung wieder aufgetreten war. Wahrscheinlich erfolgte von seiten des Pilzes infolge des Sauerstoffmangels eine aktive Reduktion des Farbstoffes, der dann an der Luft in kurzer Zeit wieder oxydiert wurde.

Im allgemeinen müssen wir gestehen, daß die Frage der Beziehungen des Farbstoffes zum Substrat tatsächlich viel komplizierter ist, als sie auf den ersten Blick erscheinen mögen. Denn sie beinhaltet die Aufgabe, aus einem Komplex von mehr oder weniger unbekannten Faktoren den einen Faktor herauszugreifen, der die Ursache einer Erscheinung ist, welche uns zwar am meisten auffällt, aber im Lebensgetriebe des Pilzes vielleicht die nebensächlichste Bedeutung hat.

Immerhin lassen sich sehr interessante Beziehungen zwischen Farbe und Stoffwechsel erwarten und es könnte die Art der Färbung vielleicht geradezu als Indikator für einen in bestimmter Richtung eingestellten Stoffwechsel gelten. Dies wird aber erst dann spruchreif sein, wenn die Konstitution des Farbstoffes einmal einwandfrei ermittelt ist und sich so die Veränderungen am Farbstoffmolekül chemisch greifen lassen.

Zusammenfassung der Ergebnisse.

Der die sogenannte Grünfäule des Holzes verursachende Pilz *Chlorosplenium aeruginosum* (Oed.) läßt sich leicht in Reinkultur ziehen. Als Ausgangsmaterial für die Reinkulturen können sowohl die Ascosporen, als auch mit dem Pilz infizierte Holzfragmente oder Stücke des Fruchtkörpers dienen.

Das Wachstum des Pilzes auf den verschiedenen Nährböden ist ein ungemein langsames und selbst auf den günstigsten erfordert es mindestens einen Monat, bis kräftige Kulturen entstehen.

Die Versuche, auf den verschiedensten festen und flüssigen Substraten (Holz als natürliches Substrat, Holzdekokt, Reis, Pflaumendekokt, Agar und Gelatine mit verschiedenen Zusätzen, anorganische Nährlösungen mit Zusatz von C- und N-Quellen) haben gezeigt, daß *Chlorosplenium aeruginosum* (Oed.) in seinem ernährungsphysiologischen Verhalten zwar nicht als besonders wählerisch zu bezeichnen ist, jedoch auf Grund der Bevorzugung von Kohlehydraten nicht zu den omnivoren Pilzen gestellt werden kann. Es ergaben sich auf den einzelnen Substraten oft ziemlich bedeutende Differenzen bezüglich Wachstumsgeschwindigkeit und Farbstoffausbildung.

Über die Art der auf dem natürlichen Substrat entfalteten saprophytischen Tätigkeit konnte bis jetzt noch kein abschließendes Urteil gewonnen werden; doch steht fest, daß für ein Anwachsen und Gedeihen des Pilzes auf Holz eine vorhergehende Veränderung

des Holzes durch andere Mikroorganismen nicht nötig ist. Der Pilz dringt vor allem durch die Gefäße ein und breitet sich dann besonders in den Parenchym- und Markstrahlzellen aus, was mit den dort vorhandenen Nährstoffen in Zusammenhang zu stehen scheint. Ein der Ernährung dienender Abbau der Membransubstanzen konnte nicht erwiesen werden, ist aber auf Grund der Kulturmöglichkeit auf Filterpapier nicht ausgeschlossen.

Das Wachstum des Pilzes ist innerhalb eines sehr weiten P_H-Bereiches möglich. Nach der sauren Seite liegt die Grenze etwa bei $P_H = 2 \cdot 4$, nach der alkalischen kaum über dem Neutralitätspunkt. Mit zunehmenden P_H-Werten erfährt der Pilzfarbstoff eine stetig fortschreitende Umwandlung von Grün gegen Braun bis zur vollständigen Farblosigkeit.

Der Pilz ist typisch aerob.

Einen großen Einfluß übt die Temperatur auf das Wachstum und die Farbstoffbildung aus. Während das Minimum bei etwa 0° zu liegen kommt, beträgt das Maximum etwa 28° C. Mit steigender Temperatur wird die Farbe der Kulturen immer heller und von 26° C an ist von einer Farbstoffbildung überhaupt nichts zu bemerken.

Licht- und Dunkelkulturen weisen im allgemeinen keine Unterschiede auf. Solche zeigten sich nur bei Kulturen auf Gelatinenährböden, doch betreffen sie hauptsächlich die Farbstoffbildung.

Von morphologischen Eigentümlichkeiten in den Kulturen ist vor allem die Schleimbildung zu nennen, die sich nicht allgemein findet, sondern vom Kulturmedium abhängig ist.

Was schließlich den Farbstoff anbelangt, so wurden die in der Literatur zerstreuten Angaben, soweit sie in Betracht kamen, nachgeprüft und zum größten Teil bestätigt. Einige neue Lösungsmittel des Farbstoffes wurden gefunden.

Es gelang, den Farbstoff auf mikrochemischem Wege zur Kristallisation zu bringen, wozu am geeignetsten Lösung in Phenol und langsame Ausfällung mit Alkohol (Alkoholkammer) erschien.

Der Farbstoff ist nicht sublimierbar, leicht reduzierbar (zu roten bis gelben Produkten) und durch geeignete Oxydationsmittel leicht wieder zu dem grünen Farbstoff zurückzuverwandeln; ferner ist er ein Indikator auf Alkalien.

Schließlich wurde der Versuch gemacht, die bei der Kultur unter verschiedenen Bedingungen auftretenden Veränderungen des Farbstoffes mit den in vitro erzielbaren Veränderungen in ursächlichen Zusammenhang zu bringen.

© Verlag Akademie der Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Literaturverzeichnis.

de Bary A., Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze. Leipzig 1884, p. 19.

Bessey E. A., Über die Bedingungen der Farbbildung bei Fusarium. Flora 1904, Bd. 93, p. 301.

Bley L. jun., Chemische Untersuchung eines eigentümlichen grünen Farbstoffs in abgestorbenem Holze. Archiv d. Pharm., 1858, p. 129 (zitiert nach Vuillemin).

Brefeld O., Untersuchungen aus dem Gesamtgebiete der Mykologie. Münster 1891, Heft 10, p. 313.

Caspary, Über *Peziza aeruginosa*. Schrift d. phys. ökon. Ges. zu Königsberg, 1864 (zitiert nach Lafar).

Claussen P., Zur Entwicklungsgeschichte der Ascomyceten. Pyronema confluens. Zeitschr. f. Botanik, 1912, Jg. 4, p. 1.

Crum-Brown A., Preliminary Note on the Colouring Matter of *Peziza aeruginosa*. Proceedings of the Roy. Soc. of Edinb. (Session 1864—1865), p. 430.

Czapek F., Biochemie der Pflanzen. 2. Aufl., Jena 1921, Bd. 3, p. 379.

Döbereiner, Fragmente der Phytochemie I. Untersuchung einer grünen Materie im faulenden Holz. Schweiggers Journal f. Chem. u. Phys., 1813, Bd. 9, p. 160.

Falck R., Über korrosive und destruktive Holzzersetzung und ihre biologische Bedeutung. Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1927, Bd. 45, p. 652.

Fordos M., Recherches sur la coloration en vert du bois mort; nouvelle matière colorante, acide xylochloérique. Comptes rendus de l'Acad. des sciences, 1863, t. 57, p. 50.

Frank A. B., Die Krankheiten der Pflanzen. Aufl., Breslau 1895, Bd. 1, p. 107.

Gümbel W., Über das grünfaule Holz, Flora 1858, Jg. 41, p. 113.

Hartig R., Lehrbuch der Baumkrankheiten. Berlin 1882, p. 98.

Klein G. und Steiner M., Stickstoffbasen im Eiweißabbau höherer Pflanzen. I. Ammoniak und flüchtige Amine. Jahrb. f. wiss. Bot., 1928, Bd. 68, p. 602.

Klein G. und Werner O., Der mikro- und histochemische Nachweis von freier und gebundener Oxalsäure, Bernsteinsäure, Apfelsäure, Weinsäure und Citronensäure. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie, 1925, Bd. 143, p. 141.

Küster E., Anleitung zur Kultur der Mikroorganismen. 3. Aufl., Leipzig und Berlin 1921, p. 80.

Lafar F., Handbuch der Technischen Mykologie. Jena 1904—1906, Bd. 3, p. 299.

Liebermann C., Über Xylindein. Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., Berlin 1874, Jg. 7, p. 1102.

Molisch H., Mikrochemie der Pflanze. 3. Aufl., Jena 1923, p. 208.

Prillieux M., Sur la coloration en vert du bois mort. Bull. de la Soc. Bot. de France, 1877, t. 24, p. 167.

Rehm H., in Rabenhorst's Kryptogamen-Flora. Aufl., 1896, Bd. 1, Abt. 3, p. 753.

Rommier M. A., Sur une nouvelle matière colorante appelée xylindéine et extraite de certains bois morts. Comptes rendus de l'Acad. des sciences, 1868, t. 66, p. 108.

Rupe H., Die Chemie der natürlichen Farbstoffe. Handb. d. Chem. Techn. Braunschweig 1900, Bd. 1, p. 281.

Sorauer P., Handbuch der Pflanzenkrankheiten. Berlin 1908, Bd. 2, p. 281.

Tschirch A., Untersuchungen über das Chlorophyll. Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1883, Bd. 1, p. 177.

— Handbuch der Pharmakognosie. 1923, Bd. 3, p. 1003.

Tulasne L. R. und C., Selecta fungorum carpologia. 1865, Bd. 3, p. 187.

Vauquelin, Ann. du Musée d'hist. nat., 1866, t. 7 (zitiert nach de Bary).

Vuillemin P., Le bois verdi. Bull. de la Soc. des Sciences de Nancy, 1897, Ser. 2, t. 15, p. 90.

Wehmer C., Über Variabilität und Speziesbestimmung bei *Penicillium*. Mycol. Centralbl., 1913, Bd. 2, p. 195.

Zellner J., Chemie der höheren Pilze. Leipzig 1907, p. 167.

Zopf W., Die Pilze. In Schenks Handbuch d. Bot., 1890, B. 4, p. 428.

Zukal H., Zur Frage grünfaulen Holze«. Österr. Botan. Zeitschr., 1887, Jg. 37, p. 41.

© Verlag der Österreichischen Akademie der Wissenschaften, Wien, download unter www.biologiezentrum.at

Tafelerklärung.

(Die folgenden Figuren beziehen sich alle auf *Chlorosplenium aeruginosum* (Oed.).

1. Wuchsform des Pilzes auf Laktoseagar als Typus der Wuchsform auf Agar überhaupt. Kulturdauer 4 Monate. Natürl. Größe.

2. Wuchsform des Pilzes auf Glukosegelatine als Typus der Wuchsform auf Gelatine überhaupt. Kulturdauer 2 Monate. Natürl. Größe.

3. Wachstum des Pilzes auf Filterpapier. Kulturdauer 4 Monate. $^3/_4$ der natürlichen Größe.

4. Farbstoffinkrustation in Form von sphäritähnlichen Aggregaten an Hyphen aus flüssigem Inulinnährboden. Vergr. 300.

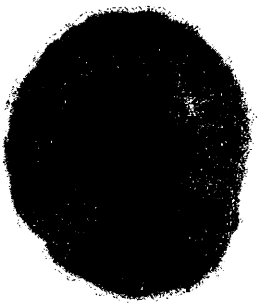
Farbstoffinkrustation in Form von sphäritähnlichen Aggregaten an Hyphen aus flüssigem Inulinnährboden. Vergr. 300.

6. Homogene Farbstoffinkrustation an Hyphen aus flüssigem Inulinnährboden. Vergr. 300.

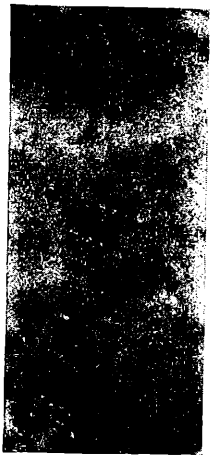
7. Tangentialschnitt durch ein künstlich infiziertes Holz von *Larix decidua*. Bei *a)* Eindringen von Pilzhyphen aus den Markstrahlzellen durch die Tüpfel in die Tracheide. Vergr. 300.

8. Xylindeinkristalle, gewonnen aus Phenollösung durch langsame Einwirkung von Alkohol. Vergr. 55.

1



2



3

4

5

6

7

8

W. Frenzel phot.